

令和 2 年 5 月 7 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18002

研究課題名(和文) オルニチン由来アルカロイドの骨格形成酵素の探索研究と微生物生産

研究課題名(英文) Study for screening enzymes involved in biosynthesis of ornithine-derived alkaloids, and microbial production

研究代表者

長谷部 文人(Hasebe, Fumihito)

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：30781801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で、我々は植物に特異なアルカロイドであるトロピノンやその中間体(N-mpyr)の微生物生産を目指し、タバコ由来プトレシンN-メチル基転移酵素(PMT)、大腸菌由来プトレシンアミノ基転移酵素(YgjG)、トマト由来CHSB、ペラドンナ由来CYP82M3、ミヤコグサ由来CYP還元酵素を大腸菌で共発現させることで、その微生物生産を達成した。また、puuCとydcWの2遺伝子を破壊した大腸菌を宿主として用いることでトロピノンやN-mpyrの増産を達成した。さらに、LC-MS分析とITC分析によりCHSBがN-mpyrを認識せず、3-オキソグルタル酸を合成する酵素であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、植物に特異な代謝産物であり、医薬品として利用されているスコポラミンやアトロピンといったトロパンアルカロイドの重要な鍵中間体であるトロピノンやN-メチル-1-ピロリニウムカチオン(N-mpyr)の微生物生産を達成した。本研究成果は、植物の生育に非依存的なトロパンアルカロイドの安価大量生産の実現に寄与すると考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attained the microbial production of plant-specific alkaloids, Tropinone and N-Methyl-1-pyrrolinium cation(N-mpyr), by co-expressing Putrescine N-methyltransferase (PMT) from *Nicotiana tabacum*, Putrescine aminotransferase (YgjG) from *Escherichia coli*, CHSB from *Solanum lycopersicum* (SICHSB), CYP82M3 from *Atropa belladonna* L., and CYP reductase from *Lotus japonicus*. We also achieved the increased production of Tropinone and N-mpyr by using *E. coli*, which disrupted two genes, puuC and ydcW, as a host. Furthermore, we revealed that SICHSB synthesizes 3-oxoglutaric acid and does not recognize N-mpyr.

研究分野：応用微生物学

キーワード：アルカロイド 微生物生産 トロピノン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アルカロイドは植物や動物、微生物などが生産し、その構造は多様である。植物由来のアルカロイドは強い生理活性を有し、医薬品として利用されている。しかしながら、これらは植物に特異な代謝産物であり、微生物による安価大量生産が実現されていない。Ornithine 由来アルカロイドは、Hyoscyamine(Tropinone 類縁体)や Nicotine など中枢・自律神経系に作用し、重要な医薬品や嗜好品の主要成分として利用されている。研究開始時点において、これらは共に *N*-Methyl- $\Delta^1$ -pyrrolinium cation(1)を鍵中間体として生合成されることが知られていたが、1 から Tropinone(2)や Nicotine への生合成は未知であり、その微生物生産は報告されていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究ではナス科の植物が生産する Hyoscyamine(Tropinone 類縁体)や Nicotine の微生物生産を目的とし、(1)大腸菌を用いた 1 の生産、(2)1 から 2 や Nicotine への生合成遺伝子/酵素の探索・同定、(3)同定した遺伝子を用いて 2 や Nicotine の微生物生産を目指した。本研究により、Ornithine 由来アルカロイドの微生物生産を実現することで、医療品等の開発が促進され、人々の健康増進に寄与できると考えている。

### 3. 研究の方法

#### (1)大腸菌を用いた 1 の生産

植物において、Ornithine から 1 への変換反応は Ornithine decarboxylase(ODC)、Putrescine *N*-methyltransferase(PMT)、*N*-Methylputrescine oxidase(MPO)の 3 つの酵素に担われることが知られている。そこで大腸菌を用いた 1 の生産を目指すために、有機合成した 1 を標品とし、大腸菌にコドン最適化したタバコ *Nicotiana tabacum* 由来の PMT と MPO を大腸菌にて共発現させ、その培養上清を LC-MS に供して分析した。また、MPO の代替酵素候補を探索し、PMT と共発現を行うことで、1 の生産検討を行った。1 の生産が確認された後に、生産培地を検討することで、その増産を試みた。

さらに 1 の微生物生産にあたり、宿主として用いる大腸菌に 1 の変換能を有する内在酵素がある場合において、その生産量低下が考えられた。そこで、1 の変換能を有する候補酵素/遺伝子を探索し、見出した候補酵素の組換え体を取得し、1 を基質として *in vitro* を行うことでその変換能を確認した。また、見出した候補遺伝子破壊株を作製し、これを宿主として 1 の微生物生産を行い、その生産量を LC-HRMS を用いて算出した。

#### (2)生合成遺伝子/酵素の探索・同定

##### 1 から 2 への生合成遺伝子/酵素の探索・同定

2 の生合成において、ラベル化酢酸の取り込み実験結果についての論文から、polyketide synthase(PKS)がその生合成に関与することが推測されていた。そこで、我々は、ナス科において全ゲノムが解読され、2 を中間体として生産し得るトマトを対象として、PKS である Chalcone Synthase(CHS)が属する pfam00195 の 6 種の遺伝子に着目した。これらの合成遺伝子を購入し、大腸菌を用いて組換え酵素の取得を試みた。取得した組換え酵素を malonyl-CoA と反応させ、反応液を LC-HRMS/UV を用いて分析した。また、期待される反応を担う酵素については、Malonyl-CoA の消費速度から、動力学パラメータの導出を行った。さらに、その酵素が認識する基質についての知見を得るために、ITC 分析を行った。

##### Nicotine 生合成関連酵素 A622 の機能探索

A622 は、Nicotine の生合成に関与する酵素として知られているが、その真の基質は明らかになっていなかった。そこで本研究では、大腸菌にコドン最適化した *N. tabacum* 由来 A622 の合成遺伝子を購入し、大腸菌を宿主として組換え A622 の取得を行い、*in vitro* 反応産物を LC-MS/UV に供することで、その真の基質探索を行った。基質候補としては、有機合成した *N*-( $\beta$ -D-Glucopyranosyl)nicotinic acid(NaG)と *N*-( $\beta$ -D-Glucopyranosyl)-6-hydroxynicotinic acid-*N*-glucoside(6-HydroxyNaG)を含む 14 種類の Nicotinic acid analogs を用いた。

#### (3) 大腸菌を用いた 2 の生産

研究実施中の 2018 年 12 月に、ベラドンナにおいて 1 から 2 への生合成に関与する酵素/遺伝子が報告された。そこで 2 の微生物生産を達成するために、(1)で作製した 1 の生産系を基盤として、関連生合成遺伝子を共発現させ、その培養上清を LC-MS に供して分析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 大腸菌を用いた 1 の生産

大腸菌を用いて PMT と MPO の組換え酵素を取得した結果、PMT の反応の再現は取れたが、MPO の活性を検出することが出来なかった。そこで 1 の微生物生産を達成するために、MPO の代替酵素として、基質特異性が寛容な大腸菌由来の Putrescine aminotransferase である YgjG に着目し、その組換え酵素を取得し *in vitro* を行った。その結果、YgjG は MPO の代替酵素として利用可能であることが明らかになった。次に、PMT と YgjG とを大腸菌で共発現させて培養し、その培養上清を LC-MS で分析した結果、1 が生産されることが明らかとなった(図 1)。

また 1 の生産培地条件を検討し、LB 培地に Glucose を終濃度 1% 添加することで、その生産量を約 8 倍上昇させることが明らかになった(図 2)。1 の生合成中間体である Putrescine を培地に添加した条件において、培養 24 h 後に 1 の減少が観測されたことから、1 を変換する酵素を大腸菌が有することが示唆された。そこで、Putrescine 異化代謝経路中において、1 の平衡状態である *N*-Methyl-aminobutanal と共通する部分構造を有する化合物を基質として認識し、酸化反応を行うことが知られている、YdcW と PuuC に着目した。その組換え体を用いて *in vitro* 反応を行った結果、それらが 1 の酸化変換能を有することを明らかにした。さらに、両遺伝子破壊株を作製し、1 の微生物生産を検討した結果、培養 24 h 以降も 1 の蓄積が確認された(図 2)。

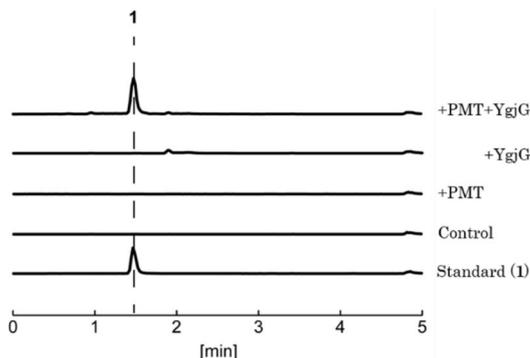


図 1: 大腸菌を用いた 1 の微生物生産

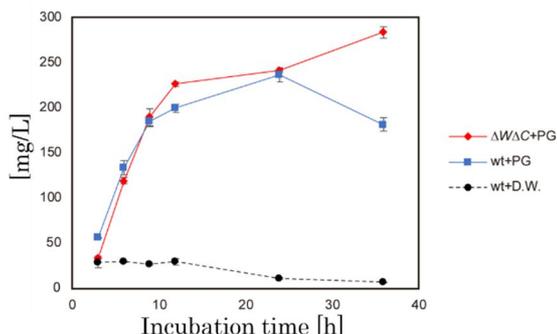


図 2: 1 の生産量比較

## (2) 生合成遺伝子/酵素の探索・同定

1 から 2 への生合成遺伝子/酵素の探索・同定  
 トマト由来の pfam00195 に属する 6 種の遺伝子について、大腸菌用にコドン最適化した合成遺伝子を用いて、その組換え体の取得および *in vitro* 反応を行った。その結果、CHSB(Protein ID: XP\_004239898)が 3-oxoglutaric acid(3) を生成する酵素であることを明らかにした(図 3)。その  $K_m$  は  $7.27 \pm 2.15$  [ $\mu\text{M}$ ]、 $k_{cat}$  は  $5.20 \pm 0.63$  [ $\text{s}^{-1}$ ]であった。

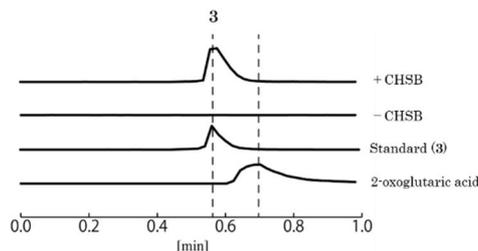


図 3: CHSB による 3 の生成

また研究期間中に、トマト由来 CHSB と相同性が 90% あるペラドンナ由来 PYKS が 2 の生合成酵素であることが他グループより報告された。その論文では、PYKS が 1 を基質として認識することで生合成反応が進行すると推測されていたが、1 と 3 は非酵素的に縮合するため、PYKS や CHSB は 1 を基質として認識はしないと考えられた。そこで CHSB を用いて isothermal titration calorimetry(ITC) 分析を行った結果、産物である CoASH に対する熱量変化は観測されたが、1 に対する熱量変化は観測されず(図 4)、CHSB は 1 を基質として認識しないこと、および真の産物が 3 であることが強く示唆された。

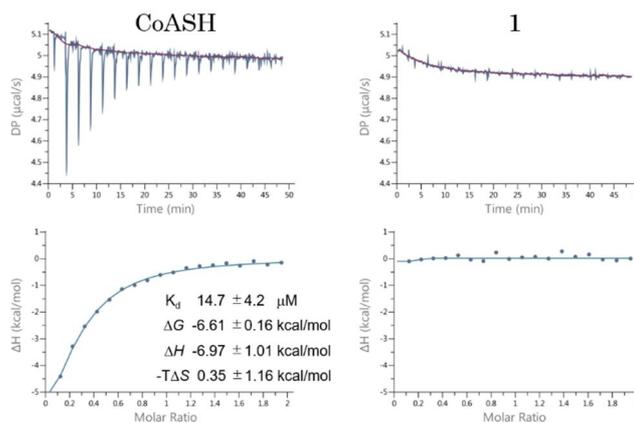


図 4: CHSB の CoASH と 1 に対する ITC 分析

## Nicotine 生合成関連酵素 A622 の機能探索

Nicotine の生合成関連酵素として知られる A622 の組換え酵素を取得し、有機合成した NaG と 6-HydroxyNaG を含む 14 種類の Nicotinic acid analogs を用いて *in vitro* 反応を行ったが、A622 による変換反応を見出すことは出来なかった。

## (3) 大腸菌を用いた 2 の生産

(1) で作製した 1 の生産系に、(2) の で同定したトマト由来 CHSB と、論文で報告されたペラドンナ由来 CYP82M3 と、共同研究者から供与していただいたミヤコグサ由来 Cytochrome P450 reductase (CPR) とを追加で共発現させ、2 の生産を検討したが、その生産は確認されなかった。そこで CYP82M3 について、コドン最適化によりレアコドンが回避された L37 の再レアコドン化を行い、再度 2 の生産を試みた。その結果、大腸菌を宿主として  $47.0 \mu\text{g/L}$  の 2 の生産を達成した。本研究成果は、トロパナルカロイド発酵生産の重要な基盤となり、その安価大量生産の実現に寄与すると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 室田健来, 長谷部文人, 大石和敬, 鮎 信学
2. 発表標題 大腸菌と酵母の共培養によるTropinone の生産
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度（令和2年度）大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 庄司 翼、長谷部 文人、弓場 穂香、鮎 信学
2. 発表標題 トロパンアルカロイド生合成を担うIII型ポリケチド合成酵素 CHSBの機能解析
3. 学会等名 第37 回日本植物細胞分子生物学会（京都）大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fumihito Hasebe, Katsuki Muroda, Tomoka Kawashima, Kazuhiro Oishi, Mioka Tani, Teruki Aizawa, and Nobutaka Funa
2. 発表標題 The microbial production of 1-methyl- 1-pyrrolinium cation, a common intermediate of nicotine and tropane alkaloids, in Escherichia coli
3. 学会等名 15th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Katsuki Muroda, Kazuhiro Ohishi, Tomoka Kawashima, Mioka Tani, Teruki Aizawa, Fumihito Hasebe, and Nobutaka Funa
2. 発表標題 Microbial production 1-methyl- 1-pyrrolinium cation, a key intermediate of ornithine-derived alkaloids
3. 学会等名 The 4th International Conference on Pharma-Food (ICPF 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomoka Kawashima, Fumihito Hasebe, and Nobutaka Funa
2. 発表標題 In vitro analysis of A622, a plausible NADPH-dependent reductase,
3. 学会等名 The 4th International Conference on Pharma-Food (ICPF 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fumihito Hasebe, Katsuki Muroda, Tomoka Kawashima, Kazuhiro Oishi, Mioka Tani, Teruki Aizawa, and Nobutaka Funa
2. 発表標題 オルニチン由来アルカロイドにおける共通生合成中間体の微生物生産
3. 学会等名 新学術領域研究「生合成リデザイン」 第2回若手シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川嶋智佳、長谷部文人、鮎信学
2. 発表標題 Nicotine の骨格形成反応を担う酵素の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会 中部支部第 183 回例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 室田健来、大石和敬、川嶋智佳、谷美生夏、相沢光輝、長谷部文人、鮎信学
2. 発表標題 大腸菌を用いたオルニチン由来アルカロイド生合成中間体の生産
3. 学会等名 日本農芸化学会 中部支部第 183 回例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川嶋智佳、長谷部文人、鮎信学
2. 発表標題 ニコチン生合成関連酵素A622の基質探索
3. 学会等名 酵素工学研究会第80回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 室田健来、大石和敬、川嶋智佳、谷美生夏、相沢光輝、長谷部文人、鮎信学
2. 発表標題 大腸菌を用いたオルニチン由来アルカロイド生合成中間体の生産
3. 学会等名 酵素工学研究会第80回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大石和敬、川嶋智佳、谷美生夏、相沢光輝、長谷部文人、鮎信学
2. 発表標題 組換え大腸菌を用いた flavonoid alkaloid の生産
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷部文人、室田健来、大石和敬、川嶋智佳、谷美生夏、相沢光輝、鮎信学
2. 発表標題 オルニチン由来アルカロイドにおける生合成中間体の微生物生産
3. 学会等名 酵素工学研究会第78回講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長谷部文人, 大石和敬, 室田健来, 川嶋智佳, 鮒 信学
2. 発表標題 オルニチン由来アルカロイドの 微生物生産系の構築にむけて
3. 学会等名 生合成リデザイン_第1回若手シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川嶋智佳, 長谷部文人, 鮒 信学
2. 発表標題 ニコチンの骨格形成反応を担う酵素の探索
3. 学会等名 生合成リデザイン_第1回若手シンポジウム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考